

甲醛致大鼠肝细胞 DNA - 蛋白质交联的研究

付 聪 王 昆 肖 琳 王红蕾 王江伟 吴 曲 蔡文君 杨 旭

摘要 目的 探讨甲醛致生物机体 DNA - 蛋白质交联(DNA - Protein crosslinks, DPC)作用。方法 研究以 Wistar 大鼠肝组织为实验材料进行体内和体外实验,采用 KCl - SDS 沉淀法来检测甲醛染毒后大鼠肝细胞 DNA - 蛋白质交联的含量。结果 低浓度的气态甲醛(0.5 mg/m^3)不能引起 DNA - 蛋白质的交联,较高浓度的甲醛(1.0 mg/m^3 , 3.0 mg/m^3)可以诱导明显的 DNA - 蛋白质交联作用($P < 0.01$);体外实验结果显示:经低浓度甲醛($12.5 \mu\text{mol/L}$)处理 1h 后,大鼠肝细胞内的 DPC 系数稍有变化,但与空白对照组相比无显著差异,而随着甲醛浓度上升,细胞中的 DPC 含量出现了显著性上升。结论 体内和体外实验表明:低浓度的甲醛不能引起 DNA - 蛋白质的交联,而较高浓度的甲醛可以引起明显的 DNA - 蛋白质的交联作用。

关键词 甲醛 KCl - SDS 沉淀法 DNA - 蛋白质交联

Study on DNA - protein Crosslinks Induced by Formaldehyde in the Liver of Mice. Fu Cong, Wang Kun, Xiao Lin, Wang Honglei, Wang Jiangwei, Wu Qu, Cai Wenjun, Yang Xu. College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

Abstract Objective To explore the (DNA - protein crosslinks, DPC) damages of rats induced by formaldehyde. **Methods** The liver cells of rats were used as experimental materials in vivo and in vitro respectively, and KCl - SDS assay was applied to determine the amount of DPC. **Results** The results in vivo showed that gaseous formaldehyde could cause DPC at high concentrations (1.0 mg/m^3 , 3.0 mg/m^3 , $P < 0.01$), but not happened the case at low concentrations (0.5 mg/m^3). Meanwhile, the results in vitro showed that liquid formaldehyde at low concentration ($12.5 \mu\text{mol/L}$) resulted in an insignificant increase in DPC content compared with control groups. But as formaldehyde concentration ascends, DPC could be formed significantly. **Conclusion** These results suggested that formaldehyde can induce DPC at relatively high concentration but not at low.

Key words Formaldehyde; In vivo; In vitro; DNA - protein crosslinks

甲醛已成为我国主要的室内空气污染物之一。2004 年世界卫生组织下属机构 - 国际癌症研究中心 (IARC) 领导的工作小组评估了甲醛致癌效应的相关研究报告后,将甲醛确定为 1A 类物质 (人类致癌物)^[1]。许多研究也证实,甲醛具有遗传毒性和致突变性,可以导致 DNA 链断裂 (DNA strand breakage)、DNA - DNA 交联 (DNA - DNA crosslinks, DDC) 以及 DNA - 蛋白质交联 (DNA - protein crosslinks, DPC), 其中 DPC 在致癌和致突变中具有至关重要的地位。因此,WHO 指出 DPC 可以作为机体潜在突变的分子标志物^[2]。由于 DPC 是癌变的重要诱因之一,甲醛与 DPC 的量效关系已被用于甲醛致癌性的危险度评价。

关于甲醛所引起的 DPC 效应,国内外已经做了相关的研究。Kuykendall 等^[3]进行了甲醛暴露大鼠鼻腔嗅细胞和呼吸道上皮细胞的实验,得出甲醛浓度

在 $100 \mu\text{mol/L}$ 及以上时 2 种细胞中 DPC 的含量都出现显著增加。Ridpath 等^[4]经研究发现在 BRCA/FANC 信号通路上有缺陷的鸡 DT40 细胞对外界环境中的甲醛极其敏感,经甲醛处理后的细胞其 DPC 系数显著上升。Shaham 等^[5]经研究认为甲醛所致的 DPC 可在体内积累,并随暴露年限的增加而增加。为了进一步探索甲醛所引起的 DPC 效应,本研究运用 SDS - KCl 沉淀法从体内实验和体外实验两个方面来检测 DPC 的形成,以期更全面更系统地了解甲醛的遗传毒性和致癌性,为制定安全的环境和职业浓度标准提供更科学的依据。

材料与方法

1. 实验材料:湖北省预防医学院实验动物中心所提供的 Wistar 大鼠,体重 140g 左右。

2. 仪器与主要试剂:(1)试剂:4% 的甲醛溶液 (SIGMA 公司),十二烷基硫酸钠 (Merk 公司),蛋白酶 K (Merk 公司),RPMI 1640 培养基 (Gibco),Hoechst33258 荧光染料 (SIGMA 公司),0.4% 台盼蓝溶液,其他试剂如 KCl、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、EDTA 均为国产分析纯。(2)仪器:416022 型甲醛测定仪 (美国 INTERSCAN 公司),三用电热恒温水箱 (北京市

基金项目:国家公益性行业科研专项经费项目 (2008467111)

作者单位:430079 武汉,华中师范大学生命科学院

通讯作者:杨旭,电子信箱:yangxu@mail.ccnu.edu.cn

长源实验仪器厂), 涡旋器, 低温冷冻离心机 (Eppendorf - 5415R), F-4500 型荧光分光光度计 (日本日立), WH22 型小型智能环境气候舱 (武汉市宇信科技开发有限公司), 用于染毒的甲醛气体采用仿真方案制备, 即采用 SIGMA 公司生产的 10% 甲醛溶液原液, 配制不同浓度的甲醛溶液, 置于 WH22 小型智能型环境气候舱通气湿度发生装置中, 通过环境气候舱设定的恒定湿度参数, 使之能稳定连续地输出实验所需浓度的气态甲醛。舱输出甲醛染毒气体的环境参数为: 舱温度 (23 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (45 ± 0.5)%, 气流量为 (1100 ± 0101) L/min。气体的甲醛浓度由 416022 型甲醛测定仪测定, 灵敏度为 $0.012\text{mg}/\text{m}^3$, 准确度为 $\pm 0.024\text{mg}/\text{m}^3$, 数字显示读数。

3. 染毒方案: (1) 气态染毒: 实验采用动态吸入式染毒, 将 24 只 Wistar 雄性大鼠随机分为 4 组: 对照组和 3 个甲醛染毒组, 每组 6 只大鼠。染毒组在玻璃染毒缸 (由 8.4 L 通气式干燥器改制而成) 中连续动态染毒 72h, 进气口甲醛浓度分别设定为 $0.5\text{mg}/\text{m}^3$ (23°C)、 $1.0\text{mg}/\text{m}^3$ (23°C) 和 $3.0\text{mg}/\text{m}^3$ (23°C); 对照组也在同样的染毒缸中吸入经过滤的新鲜空气 (甲醛浓度 $<0.01\text{mg}/\text{m}^3$)。染毒期间, 动物定时进食和饮水, 每天 2 次, 实验动物在染毒结束后立即脱颈处死, 制备密度为 $10^5 \sim 10^6$ 个/ml 的肝细胞悬液, 进行 DPC 检测。(2) 液态染毒: 颈椎脱臼处死大鼠, 迅速取出肝脏, 制备密度为 $10^5 \sim 10^6$ 个/ml 的肝细胞悬液, 细胞吹打均匀后, 向每个 1.5ml 的离心管中各加入 990 μl 悬浮细胞, 然后加入 10 μl 液态甲醛使其终浓度分别为 0, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 对照组加入 RPMI 1640 培养基 (pH = 7.5), 在 37°C 的水浴中解溶 60min。

4. DPC 的检测: DPC 采用 KCl-SDS 沉淀法检测^[3]。首先加入 SDS, 其可以和 DPC 以及其他的蛋白结合, 而不和自由的 DNA 结合; 再向样品中加入 KCl 溶液时可使 DPC 和蛋白质沉淀下来, 而自由的 DNA 留在上清液中。将上清液转移后, 再向沉淀中加入蛋白酶 K 除去蛋白质, 使 DPC 中的 DNA 游离出来, 并用荧光法测定此 DNA 的含量 A 以及原液中 DNA 的含量 B, 计算 DPC 系数 η , 以此值表示 DNA 和蛋白质的交联程度, 具体计算公式如下: $\eta = A / (A + B) \times 100\%$ 。在肝细胞悬液中分别加入 0.5ml 2% 的 SDS 溶液并轻微振荡, 然后在 65°C 水浴中加热 10min, 从水浴中取出裂解好的细胞, 加入 100 μl 溶于 20mmol/L Tris-HCl 的 1.0mol/L KCl (pH = 7.5), 将混合液 6 次穿过 1ml 的聚丙烯枪头, 从而使 DNA 长度统一。然后待混合液在冰上冷冻 5min, 形成 SDS-K⁺ 沉淀后, 再在 10000r/min, 4°C 下离心 5min 收集沉淀, 将上清液转入另一离心管 (5ml) 中。沉淀中加入 1ml 的清洗缓冲液以重悬浮, 65°C 水浴加热 10min, 冰上骤冷 5min, 重复离心和清洗步骤 3 次, 每次都得上清液转入 5ml 离心管中。最终的沉淀重悬浮于 0.5ml 的清洗缓冲液中, 然后加入 0.5ml 的蛋白酶 K (0.4mg/ml, 溶于清洗缓冲液中配制), 50°C 水浴消化 3h, 再在冰上骤冷 5min, 然后 12000r/min, 4°C 下离心 10min, 收集上清

液即为 DPC 中的 DNA。DPC 的定量: 先制作 DNA 浓度的标准曲线。用清洗缓冲液配制终浓度分别为 0、100、300、500、750、1000、1500、2000、3000、5000ng/ml 的小牛胸腺 DNA 标准液, 紧接着加入 1ml 新鲜配制的 400ng/ml 荧光染料 Hoechst33258, 使荧光染料的终浓度为 200ng/ml, 置于暗处 30min, 用 F-4500 型荧光分光光度计在 350nm 激发光和 450nm 发射光下测得各浓度的荧光值, 制备标准曲线, 如图 1 所示, 回归方程为: $y = 2.4423 + 0.0028x$, $R^2 = 0.9974$ 。将染色后的样品用 F-4500 型荧光分光光度计测定其荧光值, 根据标准曲线来定量交联 DNA 和自由 DNA, 再计算 DPC 系数 η 。

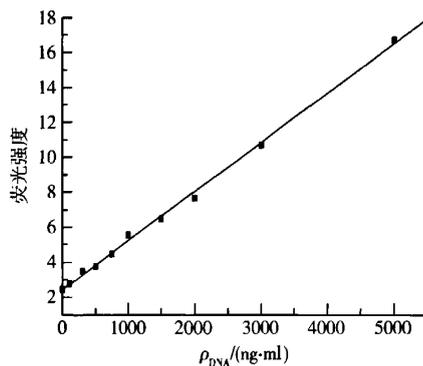


图 1 DNA 浓度的标准曲线

5. 实验数据的统计学分析: 实验测得的各项数据用 Origin6.1 统计软件分析并进行 t 检验和绘图。

结 果

1. 气态甲醛致大鼠肝细胞 DPC 效应: 用 KCl-SDS 沉淀法检测各浓度气态甲醛诱导生成 DPC 的实验结果见图 2。实验结果显示, 经 $0.5\text{mg}/\text{m}^3$ 气态甲醛染毒处理后, 小鼠肝细胞的 DPC 系数与对照组相比没有发生显著的变化; 但是, 当甲醛浓度升高到 $1.0\text{mg}/\text{m}^3$ 和 $3.0\text{mg}/\text{m}^3$ 时, DPC 系数显著上升, 且与对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$)。该结果说明气态甲醛在低浓度时, 不会引起 DNA-蛋白质交联, 在较高浓度时, 甲醛能够显著地诱导 DPC 的生成, 且甲醛浓度与 DPC 含量具有明显的量效关系。

2. 液态甲醛致大鼠肝细胞 DPC 效应: 用液态甲醛染毒大鼠肝细胞致 DPC 检测结果如图 3 所示。在经 $12.5\mu\text{mol}/\text{L}$ 甲醛处理后, 细胞内的 DPC 系数虽然稍有变化, 但是与空白对照组相比无显著差异。而当甲醛浓度上升至 $25\mu\text{mol}/\text{L}$ 及以上时, 染毒后细胞中的 DPC 系数出现了显著上升。和气态甲醛致小鼠肝细胞 DPC 的结果相比较具有相同的趋势, 甲醛在较低浓度时不能诱导 DPC 的形成或者不能显著诱导 DPC 的形成, 在较高浓度时能够显著诱导 DPC 的形成, 且

具有明显的量-效关系。

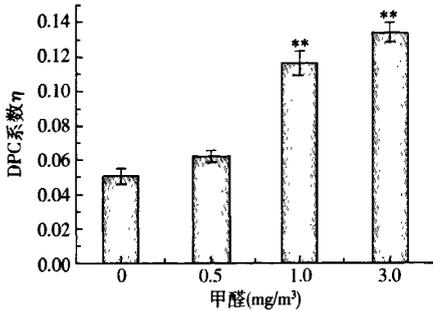


图2 不同浓度甲醛致大鼠肝细胞 DPC 效应 (** * P < 0.01)

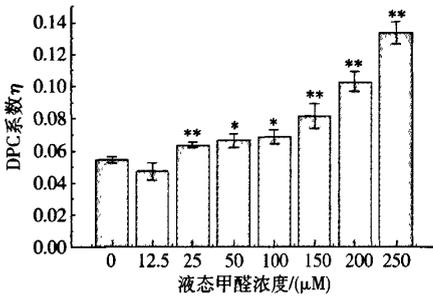


图3 不同浓度液态甲醛致 Wistar 大鼠肝细胞 DPC 效应

(* P < 0.05, ** P < 0.01, 与对照组比较)

讨 论

早在1976年Wilkins和Macleod就报道了甲醛可导致大肠杆菌发生DNA-蛋白质交联^[6]。近年来关于甲醛致DPC的研究屡有报道,我国的研究也比较多。刘英帅等^[7]以人血淋巴为研究材料,证实了在高浓度甲醛染毒时,可显著诱导蛋白质交联。吴凯等^[8]也发现,较高浓度的甲醛可导致小鼠肺明显的DPC交联。在正常细胞中存在一定量的DPC,这是DNA与核蛋白的正常联系或其代谢的结果,对维持细胞的正常生理活动具有重要作用,当有外来物理、化学因素作用时,则可诱导过量的DPC,甲醛是醛类化合物中最简单的小分子,其毒性效应的一个重要方面是源于它的羰基亲电性和较小的空间位阻,使其易于与核酸和蛋白质发生交联。在体内或体外甲醛先与蛋白质或核酸上自由的氨基反应生成不稳定的羟甲基加合物,然后再进一步与核酸或蛋白质反应形成稳定的交物,甲醛主要引起DNA和组蛋白的交联,该过程是甲醛先快速和组蛋白反应,然后再和DNA

环的氨基结合形成DPC,主要涉及组蛋白赖氨酸的ε-氨基和A/G碱基的环外氨基其主要结构为:histone-NH-CH₂-NH-DNA。另外,甲醛也可损害生物体抗氧化系统并可作为抗氧化酶的抑制剂,间接导致DPC的增加。例如,甲醛可以引起还原性GSH的耗竭,抑制谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶等抗氧化酶的活性,使羟自由基和氧自由基清除不力,导致DPC含量的增加。

本实验以大鼠肝细胞为实验材料,是因为肝脏是大鼠的主要解毒器官,本研究以KCl-SDS沉淀法检测染毒后肝脏的DPC系数,结果表明:低浓度的气态甲醛(0.5 mg/m³)不能引起DNA-蛋白质的交联,较高浓度的甲醛(1.0 mg/m³, 3.0 mg/m³, P < 0.01)可以产生明显的DNA-蛋白质交联作用;体外实验结果表明:经低浓度液态甲醛(12.5 μmol/L)处理后,大鼠肝细胞内的DPC系数虽然稍有变化,但是与空白对照组相比较无显著差异,而当甲醛浓度上升至25 μmol/L及以上时,细胞中的DPC系数出现了极显著上升。DPC的检测方法是在分子水平上检测甲醛对遗传物质的损伤作用,将甲醛对动物的毒性研究深入到分子水平,并进一步探讨其分子机制有着重要的意义。本实验结果表明甲醛大鼠肝脏遗传物质造成了较严重的损伤。

参考文献

- 1 International Agency for Research on Cancer. IARC classifies formaldehyde as carcinogenic to humans [OL]. 2004-06-15
- 2 Liteplo R G, Beauchamp R, Meek M E, et al. Formaldehyde Concise International Chemical Assessment Document 40 [OL]. 2002-9
- 3 Kuykendall J R, Trela B A, Bogdanffy M S. DNA-protein crosslinks formation in rat nasal epithelial cells by hexamethylphosphoramide and its correlation with formaldehyde production [J]. Mutation Research, 1995, 343: 209-218
- 4 Ridpath JR, Nakamura A, Tano K, Luke AM, et al. Cells deficient in the FANC/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde [J]. Cancer Research, 2007, 67(23): 11117-11122
- 5 Shaham J, Bomstein Y, Meltzer A, et al. DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde - in vitro and in vivo studies [J]. Carcinogenesis, 1996, 17(1): 121-125
- 6 Wilkins R J, Macleod H D. Formaldehyde induced DNA-protein crosslinks in escherichia Cob [J]. Mutation Research, 1976, 36
- 7 刘英帅, 鲁志松, 杨继文, 等. 甲醛致人血淋巴细胞DNA-蛋白质交联作用的定量研究 [J]. 湖北预防医学研究杂志, 1994, 15(4): 4-7
- 8 吴凯, 杨光涛, 娄小华, 等. 甲醛致小鼠肺DNA-蛋白质交联和断裂效应的研究 [J]. 公共卫生与预防医学, 2006, 17(2): 15-18

(收稿: 2008-05-07)